第 37 卷第 8 期 生 态 学 报 Vol.37,No.8
2017 年 4 月 ACTA ECOLOGICA SINICA Apr.,2017

DOI: 10.5846/stxb201412262581
赵昕宇, 何小松,檀文炳,高如泰,席北斗, 李丹, 张慧.典型胞外呼吸细菌的胞内电子转移机制研究进展.生态学报,2017,37(8):2540-2550.
Zhao X Y, He X S, Tan W B, Gao R T, Xi B D, Li D, Zhang H.Intracellular electron transfer mechanism of typical extracellular respiratory bacteria.Acta Ecologica Sinica,2017,37(8):2540-2550.

典型胞外呼吸细菌的胞内电子转移机制研究进展

赵昕宇[1,2,3], 何小松[2,3,4,*],檀文炳[2,3],高如泰[2,3],席北斗[1,2,3], 李 丹[2,3], 张 慧[2,3]
1 北京师范大学水科学研究院,北京 100875
2 中国环境科学研究院环境基准与风险评估国家重点实验室,北京 100012
3 中国环境科学研究院地下水与环境系统创新基地,北京 100012
4 广东省浩蓝环保水污染治理院士工作站,广州 510631

摘要:胞外呼吸在污染物的降解转化和微生物产电过程中具有重要作用。微生物进行胞外呼吸时,其电子受体多以固态形式存在于胞外,氧化产生的电子必须通过电子传递链从胞内经细胞周质转移到外膜。*S.oneidensis* MR-1 与 *G. Sulfurreducens* 作为微生物燃料电池中最常用的模式菌株,是现阶段研究最深入和系统的胞外呼吸细菌,其胞内电子传递过程目前研究最为清楚。这两种胞外呼吸细菌的电子传递需多种细胞色素 c 的参与,*S.oneidensis* MR-1 位于内膜及周质上的细胞色素 c-CymA 和 MtrA 可将电子由内膜上的醌池通过周质到外膜蛋白 MtrC 和 OmcA,MtrC 和 OmcA 接收电子后可直接还原胞外受体,Type Ⅱ secretion system 对外膜蛋白中的 MtrC 和 OmcA 起到了转运及定位的作用。而在 *G. sulfurreducens* 中,电子由 MacA 传递到 PpcA,最终由外膜蛋白 OmcB、OmcE、OmcS 及 OmcZ 接受电子,并在 Type Ⅳ pili 的共同作用下将电子传递到胞外电子受体。本文最后指出目前对 *Shewanella* 与 *Geobacter* 胞内电子转移研究尚不清楚的地方提出展望。

关键词:胞外呼吸;胞内电子转移;*Shewanella*;*Geobacter*

Intracellular electron transfer mechanism of typical extracellular respiratory bacteria

ZHAO Xinyu[1,2,3], HE Xiaosong[2,3,4,*], TAN Wenbing[2,3], GAO Rutai[2,3], XI Beidou[1,2,3], LI Dan[2,3], ZHANG Hui[2,3]
1 *College of Water Science, Beijing Normal University, Beijing* 100875, *China*
2 *State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing* 100012, *China*
3 *Innovation Base of Ground Water & Environmental System Engineering, Chinese Research Academy of Environmental Science, Beijing* 100012, *China*
4 *CNHOMELAND Environmental Protection Water Pollution Governance Academician Workstation, Guangzhou* 510631, *China*

Abstract: The reduction of humus and metals such as Fe and Mn is a challenge for microorganisms, as these substances have low water solubility and cannot enter into cell envelopes. Extracellular electron transfer is defined as the process through which electrons derived from the oxidation of electron donors are transferred from the inner membrane to the outer membrane of the cell to reduce an extracellular terminal electron acceptor. *S. oneidensis* MR-1 and *G. sulfurreducens* are the most frequently used organisms for extracellular respiratory bacteria experiments because they have developed electron transfer strategies that require mutiheme *c*-type cytochromes (*c*-Cyts). In *S. oneidensis* MR-1, multiheme *c*-Cyts, CymA, and MtrA are believed to transfer electrons from the inner membrane qunione/quinol pool through the periplasm to the outer membrane (OmcA, MtrC). The Type Ⅱ secretion system of *S. oneidensis* MR-1 was due to the direct involvement of

基金项目:国家杰出青年科学基金项目(51325804);国家自然科学青年基金项目(51408573)
收稿日期:2014-12-26; **网络出版日期**:2016-10-29
* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: hexs82@126.com

translocation of MtrC and OmcA to the bacterial cell surface. The decaheme *c*-Cyts, MtrC, and OmcA can directly reduce the extracellular electron acceptors. Likewise, for *G. sulfurreducens*, MacA delivered electrons from the inner membrane to PpcA in periplasm, and PpcA subsequently transferred electrons to the OMCs (OmcB, OmcE, OmcS, and OmcZ) and Type Ⅳ pili that were hypothesized to relay the electrons to extracellular electron acceptors. This review summarizes the recent advances of extracellular electron transfer mechanisms with a focus on *Shewanella* and *Geobacter*.

Key Words: extracellular respiration; intracellular electron transfer; *Shewanella*; *Geobacter*

电子转移是新陈代谢的基础,在细胞水平的研究领域中,现如今所了解的电子转移机制有光合作用和呼吸作用。在这两种电子传递链中,水溶性电子受体如氧气、硝酸盐、延胡索酸等,可以通过细胞质膜,穿过外膜蛋白或肽聚糖层,接受电子从而完成电子传递过程[1]。胞外呼吸是近年来新发现的微生物能量代谢方式,它是指在厌氧条件下,微生物在胞内彻底氧化有机物释放电子,产生的电子经胞内呼吸链传递到胞外电子受体使其还原并产生能量维持微生物自身的生长过程[2]。这与传统胞内厌氧呼吸不同,胞外电子受体为固体或大分子有机物,无法进入胞内,因此,电子要在多种细胞色素 c 及功能蛋白作用下,从内膜通过周质空间穿过外膜,传至胞外受体使其还原,并产生能量维持自身的生长[2-3]。

胞外呼吸菌在环境中广泛存在,人们已经在土壤、泥炭、污泥、湖泊沉积物、河流沉积物、海洋沉积物以及水体等环境介质中分离富集出了许多具有胞外呼吸功能的微生物,而且在地球化学循环(碳、氮、硫)、污染物降解以及微生物燃烧料电池方面发挥重要作用[4]。根据胞外电子受体的不同,微生物胞外呼吸菌主要分为腐殖质还原菌、异化金属还原菌和产电微生物[5-7]。除了常规微生物,许多极端环境微生物也具有胞外电子传递能力,例如嗜热菌、嗜酸菌、嗜碱菌等[8]。根据对氧气的需求,胞外呼吸菌可分为兼性厌氧菌和严格厌氧菌。其中大部分集中在以下 3 个门:*Proteobacteria*(变形杆菌门)、*Acidobacteria*(放线菌门)与 *Firmicutes*(厚壁菌门)[4]。已发现的胞外呼吸菌种大多数为革兰氏阴性菌,只有少数为阳性菌。目前报道的胞外呼吸菌的数量仅占自然界的极小部分,很多菌的功能机制还不完全清楚。随着研究的不断深入以及微生物分离方法和分子生物学技术的不断完善,胞外呼吸菌的资源将会继续不断被发现和丰富。

Shewanella oneidensis MR-1 与 *Geobacter sulfurreducens* 作为微生物燃料电池中最常用的模式菌株,是迄今为止研究最深入和系统的胞外呼吸细菌[11]。到目前为止,两种微生物基因组的研究发现在 *S.oneidensis* MR-1 和 *G. sulfurreducens* PCA 中分别有 42 个和 111 个与细胞膜相关的细胞色素 c 基因[9-10],但已经确定功能的细胞色素 c 仅有几种,且大量的基因功能还不完全清楚。尽管这两种功能菌参与电子传递的细胞色素 c 各不相同,但都可催化化学反应及其相应的电化学性能,使得电子由内膜向胞外的最终电子受体传递,再通过不同的接触机制对胞外电子受体进行还原。本文详细阐述了 *S.oneidensis* MR-1 与 *G. sulfurreducens* 的胞内电子转移机制和参与胞内电子转移细胞色素 c 的特点及功能,以期对胞内电子转移机制有更全面、深入的理解和认识。

1　电子转移过程中的细胞色素 c

细胞色素 c 普遍存在于几乎所有的生物体中,它也是参与胞外电子传递过程的重要蛋白,存在于胞外呼吸菌的内膜、周质及外膜蛋白中,能够介导电子从内膜向外膜的传递[11]。不同细胞色素 c 的氨基酸序列各不相同,但它们都至少含有一种或几种亚铁血红素。两个邻近的血红素通过半胱氨酸(Cys)的硫醚键与蛋白部分相结合,从而促进其与氧气结合的能力,其催化作用、电子转移及积累能力取决于与其结合的功能蛋白[12-13]。多个亚铁血红素基团可还可形成一个连续的"电子导线",并与蛋白复合形成多亚铁血红素的细胞色素 c,而细胞色素 c 中至少有一个血红素基团与另一个细胞色素 c 的血红素基团接近,从而完成多个细胞色素 c 间的长距离的电子传递[13]。

2 *S.oneidensis* MR-1 参与电子传递的细胞色素 c

S.oneidensis MR-1 通过质子泵产生电子,电子经脱氢酶(如甲酸脱氢酶或氢化酶)将醌还原为对苯二酚,对苯二酚在胞内再次被氧化,产生的电子进入周质内可以对可溶性电子受体直接还原(如延胡索酸、硝酸盐、三甲胺氧化氮、二甲亚砜、亚硫酸盐及硫代硫酸盐)[14]。而不能进入胞内的大分子电子受体(如 Fe(Ⅲ)、Mn(Ⅴ)、Cr(Ⅵ)及腐殖酸等),需要特殊的电子传递途径将电子传递到胞外。

胞内电子传递过程中的首先是脱氢酶从电子供体脱下电子,传递给醌类中间体。Saffarini 等[15]用转座子 TN5 插入突变得到甲基萘醌合成缺陷型的菌株,证明了甲基萘醌是胞内电子传递中的一个必要构件。电子从醌类中间体传递给镶嵌到内膜蛋白的 CymA,再由 CymA 传递至周质细胞色素并向外膜蛋白传递(图 1),目前发现镶嵌在周质和外膜上的 MtrA 是这一过程的主要电子受体,MtrA 缺失将导致细胞与胞外电子受体之间的电子传递下降 90%以上[16-18]。而后电子从 MtrA 向胞外传递,即外膜电子传递。尽管目前关于外膜电子传递的机制还不甚清楚,但有一个共同的认识是,无论是将电子直接传递至不同的电子受体或是传递至可溶性的电子穿梭体,外膜蛋白细胞色素 c(OM *c*-Cyt)在这一过程中扮演着至关重要的角色[19]。MtrB 接受 MtrA 的电子,并传递给外膜蛋白 OmcA 和 MtrC,后两者通常被认为是 *Shewanella* 胞外电子传递的末端还原酶。

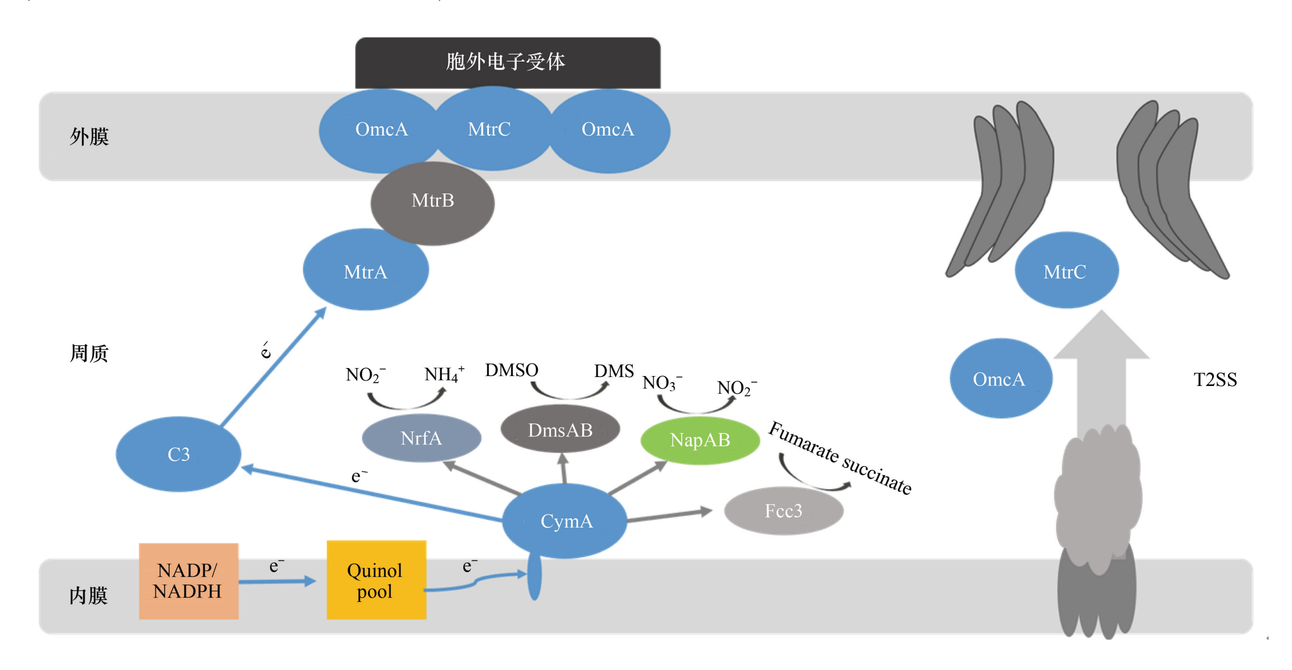


图 1 *S.oneidensis* MR-1 胞内电子转移机制

Fig.1 Intracellular electron transfer mechanism by *S.oneidensis* MR-1

2.1 CymA

CymA(SO_4591)参与 *Shewanella* 的厌氧呼吸过程,含 4 个血红素,与 NapC/NirT 结构类似,其 N 端镶嵌于内膜蛋白,C 端连接 4 个血红素延伸至周质蛋白中(图 1)。CymA 是 *Shewanella* 中起重要呼吸功能的细胞色素,当缺失编码 CymA 的基因时,其最终电子受体的还原能力下降了 80%—100%[20]。另有研究表明,厌氧条件下,CymA 作为内膜蛋白中醌泵与终端还原酶的电子传递链的中间体,可以对周质蛋白中延胡索酸盐、硝酸盐、亚硝酸盐、DMSO 及外膜蛋白的 Fe(Ⅲ)和 Mn(Ⅴ)进行还原,但仅通过细胞色素 c3 才可将电子传递到 MtrA(图 1)[21-22]。而除去与内膜蛋白相联 N 端的 CymA 仍保留其还原延胡索酸的能力,却丧失对周质中间体细胞色素 c3 的还原[21, 23]。为进一步证明这个结果,以电极作为 *S.oneidensis* MR-1 的电子供体对延胡索酸进行还原,结果表明 85%的电子通过 CymA 传递到延胡索酸,仅有 15%通过周质穿梭体传递到 MtrA,这不仅说明 FR 的氧化还原电势要高于细胞色素 c3,而且 CymA-FR-MtrA 在周质中形成了传递电子的复合体[23-24]。

2.2 MtrA

编码 MtrA 的基因为 SO_1777,与编码 MtrB (SO_1776)、MtrC(SO_1778)和 OmcA(SO_1779)的基因位于同一基因群。MtrA 位于周质蛋白中,含有 10 个血红素,在胞外电子受体的电子传递过程中起主要作用[18]。将缺失 *mtrA* 的突变菌株与野生菌株相比,突变菌株对柠檬酸铁及金属氧化物(Fe 和 Mn)的还原能力大大减弱,而对延胡索酸盐、硝酸盐、亚硝酸盐、DMSO、TMAO 及硫代硫酸盐的还原没有影响,说明 MtrA 是胞外电子传递过程中必要的特异蛋白[16]。但 MtrA 位于周质内,并不能与胞外电子受体直接接触,因此,电子要通过周质蛋白应传递到 MtrB。MtrB 是一种不含血红素的跨外膜蛋白,作为保护鞘参与了 MtrA 和 MtrC 之间的电子传递,并促进 OmcA 和 OmcB 在 MR-1 内的转移和定位,是金属氧化物还原过程中不可缺少的重要蛋白[17]。但 MtrB 如何将电子转移到外膜的过程尚不清楚。

2.3 MtrC 和 OmcA

MtrC 和 OmcA 是位于外膜蛋白的脂蛋白,各含 10 个血红素[25-26],可将电子直接转移到胞外电子受体。与 MtrA 相同,缺失编码 *omcA* 或 *mtrC* 基因的突变体对可溶性电子受体的还原并无影响,但对胞外金属氧化物(Fe 和 Mn)还原能力显著下降,与野生菌株相比分别降低了 45%和 75%[27]。MtrC 和 OmcA 都具有向胞外传递电子转移的能力,但在 *Shewanella* 的电子传递过程中 MtrC 要起到更主要的作用[28-29]。这一结果被 Jimmy 等[30]再次证明:在柠檬酸铁中培养缺失 *mtrC* 的突变菌株,发现其还原能力要明显低于缺失 *omcA* 的突变菌株,证实 MtrC 是柠檬酸铁的主要还原酶。这主要是由于:(1) MtrC 稳定态的浓度要高于 OmcA;(2)插入失活的 OmcA 会导致 MtrC 含量的增加,反之不成立;(3)OmcA 与 MtrC 在动力学方面的行为模式不同;(4)MtrC 是 OmcA 发挥功能的必要条件。此研究也首次证明,OmcA 与 MtrC 是 MR-1 中唯一能够将电子转移到 Fe(Ⅲ)的细胞色素[30]。

缺失 *mtrC* 的突变体其外膜上细胞色素 c 的含量不足野生菌株的 15%,说明 *mtrC* 对外膜其它细胞色素 c 的合成起到一定作用。对于缺失 *OmcA* 的突变菌株,*MtrC* 仍可在胞质内合成 OmcA,但不能使其转移到外膜[31]。为了进一步说明 OmcA 和 MtrC 在电子传递过程中的作用及关系,Liang 等[11]将两个多血红素细胞色素 c 从野生菌株中分离纯化后合成复合蛋白,由于复合体中 MtrC∶OmcA 为 1:2,也就是说外膜蛋白中至少含有 30 个血红素,OmcA 和 MtrC 复合体柠檬酸铁的还原能力要远远高于其中任意单个蛋白,OmcA 和 MtrC 在 MR-1 的外膜蛋白中紧密结合成了一个稳定的蛋白复合物并在电子传递途径中发挥了重要作用。

OmcA 和 MtrC 对不同电子受体的还原具有特异性,Shi 等[11]将胞外电子受体 V(Ⅴ)、U(Ⅵ)及 Se(Ⅵ)作为 Fe(Ⅲ)还原的竞争性底物,仅有 V(Ⅴ)与 Fe(Ⅲ)为共同的胞外电子受体时,Fe(Ⅲ)的还原效率会明显降低,而 U(Ⅵ)和 Se(Ⅵ)对 Fe(Ⅲ)的还原并无显著影响,因此在 OmcA 和 MtrC 对 U(Ⅵ)及 Se(Ⅵ)的还原并不起主要作用。

2.4 T2SS

T2SS (Type Ⅱ secretion system) 是 *Shewanella* 的蛋白分泌系统,在胞外电子传递中也起到十分重要的作用(图 1)。T2SS 由多种蛋白组成,如 GspD、GspE 与 GspG[32]。研究表明,插入失活的 *gspE* 的突变体对 Fe(Ⅲ)或 Mn(Ⅴ)的还原能力减弱,这也是首次证明了 T2SS 参与了金属氧化物(Fe 和 Mn)的还原[33]。随后 Shi[34]首次证明了 T2SS 在 MtrC 与 OmcA 的转移中起到了直接作用,缺失编码 T2SS 的基因丧失了培养基中 *S. oneidensis* 释放 MtrC 和 OmcA 的能力;并且缺失 T2SS 的 *S.oneidensis* MR-1 突变体与缺失 *mtrC/omcA* 突变体有相似的表型,导致其突变体在生物电池中的产电能力下降[35]。MtrC 和 OmcA 向外膜转移的顺序为[34]:(1)在胞质内合成;(2)通过 Sec 途径跨过内膜;(3)在周质内成熟;(4)通过 T2SS 转移到外膜。

2.5 电子转移模块

对于 *S.oneidensis* MR-1,单个基因或多个基因(*cymA* 或 *mtrABC*)的敲除并不完全使电流消失,说明在电子传递过程中还存在其它可以代替上述蛋白的结构。基因组分析表明编码 MtrABC 的一系列同族蛋白在相同的操纵子上可编码。其中 MtrA 的同族蛋白包括 MtrD、DmsE 与 SO4360;MtrC 的同族蛋白为 OmcA 和 MtrF;

MtrB 有 3 个同族蛋白分为 MtrE、dmsF 与 SO4359。这些同族蛋白组成的电子转移模块也可将电子从醌池转移到胞外的电子受体,但其发挥的作用各不相同[36]。目前已经对其中外膜电子传递通道中的一种十血红素辅基细胞色素(MtrF)进行了 X 射线晶体结构解析。根据这个结构模型,可以研究不同类型的胞内电子传递或解析可能的胞内电子传递发生机制。MtrF 晶体结构的解析第一次确定了 10 个血红素的空间排布构型,其中血红素以一种独特的交叉构型贯穿在 4 个结构域(Domains Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ)中[37]。这个结构可以为人们提供分子水平研究的可能性,用于分析胞外呼吸菌如何还原不溶性底物(如矿物)、可溶性底物(如黄素)以及与细胞表面不同氧化还原细胞色素终端之间形成的电子传递链[37]。

通过其不同基因缺失的突变体对柠檬酸铁的还原可知,在 MtrA 和 OmcA 存在的条件下,MtrD 促进了电子的传递,而 SO4360 在电子传递过程中的贡献较少,也就是说在功能上,MtrA 的同族蛋白可取代 MtrA,其还原柠檬酸铁的顺序为 MtrD > DmsE >> SO4360。缺失 *mtrF* 的突变菌株对柠檬酸铁的还原量与野生菌株相差不大,但对黄素及可溶性电子受体的还原能力要强于 OmcA 和 MtrC,而 MtrE 在功上可替代 MtrB。MtrDEF 在 *Shewanella* 中形成了与 MtrCBA 重叠或交叉的呼吸网络,对 *Shewanella* 的极端厌氧呼吸过程而言也起到至关重要的作用[36]。

Shewanella 中最主要的电子传递模块是 MtrCAB,由基因 *omcA-mtrCAB* 编码,位于外膜的细胞色素 c(MtrC 与 OmcA)可将电子直接传递到胞外受体,但由于外膜的宽度为 40 Å,MtrA 和 MtrC 位于外膜的两侧,电子无法从内膜直接传递到外膜,需要通过中间体传递电子 MtrB 来完成内膜与外膜间的电子传递[38]。Richard 等[39]还提出了一种外膜蛋白组成的电子传递通道复合体的分子结构,由 MtrC、OmcA、MtrA 及 MtrB 构成,其中 MtrA 是基于两个五血红素辅基 NrfB 单体末端相连组成的[40],MtrC 和 MtrA 嵌入孔蛋白的深度是未知的。目前实验方法还无法研究蛋白内沿着血红素组成的通道进行的电子传递过程,而高性能计算则可以从分子水平解析血红素分子之间电子传递的热力学和动力学性质[41]。采用这些蛋白组成独特的分子机器进行长距离的电子传输,转移电子的距离可以超过 100 Å,这对于生物纳米技术设备的设计具有显而易见的科学意义。

3 *G. sulfurreducens* 中参与电子转移的细胞色素 c

Geobacter 的电子传递机制与 *Shewanella* 存在较大差异,*Shewanella* 可产生电子穿梭体将电子间接传递到胞外受体,而 *Geobacter* 则需要与胞外受体直接接触才可使其还原[42-44]。二者胞内细胞色素 c 种类与功能也各不相同,*G. sulfurreducens* 的细胞色素 c 中含有 100 多个基因,并产生大量的细胞色素 c,远多于 *S.oneidensis* MR-1[10]。其中参与胞外电子传递细胞色素 c 包括 MacA(位于内膜表面与胞质相连[45])、PpcA(存在胞质中[46]),以及位于外膜蛋白的 OMCs(包括 OmcB、OmcE、OmcS 及 OmcZ)(图 2)[47]。图 2 比较了 *Shewanella* MR-1 和 *G. sulfurreducens* 胞外电子传递链的组成。

3.1 MacA 和 PpcA

MacA 和 PpcA 是位于周质内的两个细胞色素 c,它们将细胞色素的内膜与外膜相联,可使电子从周质传递到胞外的电子受体。MacA 的分子量为 35kDa[45]。X-射线衍射对 MacA 三维结构分析结果显示,它主要包含两个球状结构,其中各含一个亚铁血红素基团[42]。由于 MacA 表面带正电荷,可与细胞质膜中带负电荷的表面紧密相联,并通过 PpcA 将电子传递到外膜蛋白。基因 *macA* 在 Fe(Ⅲ)作为最终电子受体时的表达能力要明显高于延胡索酸[45]。与野生菌株相比,缺失 *macA* 对氧化应激反应并无影响,而其还原 Fe(Ⅲ)的能力明显降低,说明 MacA 是调节电子向 Fe(Ⅲ)传递的主要蛋白。然而,随后的研究中表明,缺失 *macA* 的突变体并不能使电流完全消使,但 *omcB* 的反转录及蛋白质水平明显降低[48],并且 *omcB* 的反式表达使缺失 *macA* 的突变体对 Fe(Ⅲ)的还原速率与 *omcB* 的表达成正相关。也就是说,MacA 并不直接参与电子传递的过程,而是通过对 *omcB* 的表达调控间接影响胞外受体的还原能力[48]。而在近年来的研究中表明,MacA 除可间接参与电子传递过程外,它与细菌细胞色素 c 的过氧化物酶也具有高度的相似性,说明 MacA 还是 *Geobacter* 在氧过量而发生中毒时可自身解毒的必要蛋白[49]。

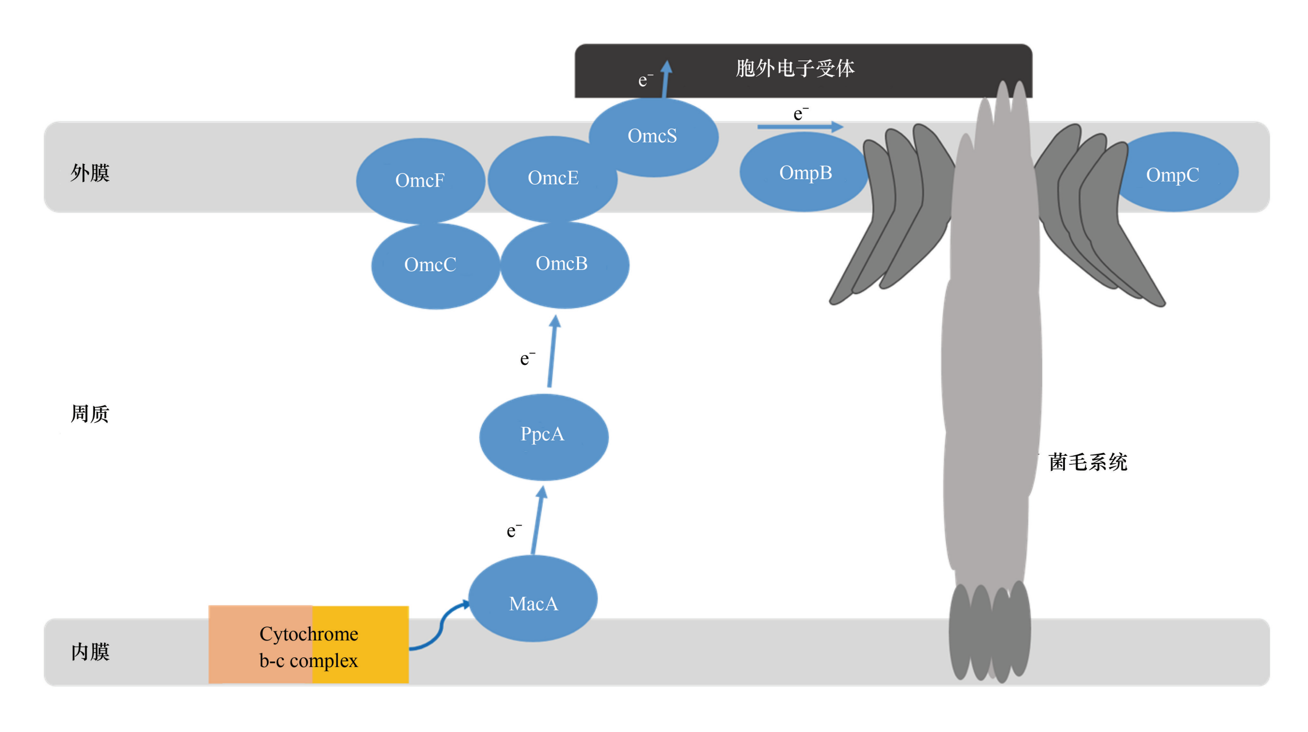


图 2　*G. sulfurreducens* 胞内电子转移机制

Fig.2　Intracellular electron transfer mechanism by *G. sulfurreducens*

PpcA 位于周质内，分子量为 9.6kDa，包含 3 个血红素和 1 个疏水信号肽，等电点为 9.5，其 N 端的氨基酸序列与硫还原单胞菌中含 3 个血红素的细胞色素 c7 紧密相联[46]。缺失 *ppcA* 的突变体对延胡索酸还原影响并不显著，而对 Fe(Ⅲ)、AQDS 及 U(Ⅵ)的还原速率明显降低，因此 PpcA 作为周质中的电子载体，可将电子传递到外膜蛋白的最终还原电子受体如 Fe(Ⅲ)还原酶、腐殖质、AQDS 及金属氧化物(Fe 和 Mn)。PpcA 的 4 个同源蛋白也位于周质内，分别为 PpcB、PpcC、PpcD 及 PpcE，与 PpcA 氨基酸序列的相似度分别为 77%、62%、57%和 65%[46]。在缺失 *ppcA* 时，PpcB-E 的含量增多，可部分补偿 PpcA 的缺失。而缺失 *ppcB-E*，PpcA 含量也会增多，而且其还原可溶性 Fe(Ⅲ)的量要高于野生菌株，说明 PpcA 是周质中最有效的电子载体[46]。

3.2　OmcB

OmcB 是第一个被发现对可溶性 Fe(Ⅲ)和 Fe(Ⅲ)氧化物都有还原能力的细胞色素 c[50]。为进一步证明这一观点，微阵列分析表明 *omcB* 的反转录水平与它在 Fe(Ⅲ)氧化物及柠檬酸铁的生长程度类似，说明两种受体分别被还原时，OmcB 蛋白的含量相当[51]。这种高分子量的细胞色素 c 具有 12 个可与亚铁血红素结合的位点，其 N 端含有 10 个氨基酸脂蛋白信号肽，位于外膜蛋白，部分暴露于胞外空间。OmcC 是 OmcB 唯一的同源蛋白，二者相似度为 73%，但它并不参与 Fe(Ⅲ)和 Mn(Ⅴ)的还原[50]。缺失 *omcB* 的突变体对可溶性 Fe(Ⅲ)和 Fe(Ⅲ)氧化物的还原能力都大大降低，说明电子传递从周质到 OmcB 的传递过程是 Fe(Ⅲ)还原的重要途径，但对 Mn(Ⅴ)的还原并无影响，也就是说，电子从胞内转移递到 Mn(Ⅴ)还可能存在多种其它途径[50,52]。

3.3　OmcS 和 OmcE

OmcS 和 OmcE 位于外膜蛋白，松驰的附着在细胞表面[47]。缺失 *omcS* 与 *omcE* 的突变体大大降低了 Fe(Ⅲ)氧化物的还原能力，但对可溶性电子受体及柠檬酸铁的还原并无影响，因此缺失这两种蛋白并不影响电流的产生[28]。

OmcS 是硫还原单胞菌中含量最丰富的细胞色素 c，其分子量大小为 50kDa，位于外膜蛋白，含有 6 个亚铁血红素。*omcS*(GSU2504)在 Fe(Ⅲ)或 Mn(Ⅴ)氧化物分别作为电子受体进行培养时，转录水平有很大提高，*omcS* 的同族基因 *omcT*(GSU2503)位于 *omcS* 的下游，二者具有相同的操纵子，氨基酸序列相似度为62.6%[53]。

在 Fe(Ⅲ)氧化物作为电子受体培养的菌株中,基因 *omcS* 与 *omcT* 转录水平均是以柠檬酸铁作电子受体的 28.3 倍;而 Mn(Ⅴ)氧化物作子受体时,其转录水平分别是柠檬酸铁作电子受体 13.8 和 52.2 倍[52],OmcS 还可促进电子从菌毛传递到 Fe(Ⅲ)氧化物,说明 OmcS 是金属氧化物(Fe 和 Mn)的最终还原酶[54]。尽管 *omcT* 具有很强的表达能力,但 OmcT 在 Fe(Ⅲ)氧化物生长的细胞蛋白质组中的含量并不丰富[28],并且缺失 *omcT* 对金属氧化物(Fe 和 Mn)的还原并无显著影响[55]。

OmcE(GSU0618)含有 4 个血红素,分子量大小为 30kDa。在 Fe(Ⅲ)氧化物电子供体时,细胞中 *omcE* 的转录水平是柠檬酸铁的 3 倍,但在 Mn(Ⅴ)作为电子受体时,*omcE* 的转录水平并没有升高[52]。有研究表明,缺失 *omcE* 会短暂抑制 Fe(Ⅲ)和 Mn(Ⅴ)氧化物的还原,但随着时间增加,两种氧化物的还原能力又恢复到正常水平。因此,与 OmcS 相比,OmsE 不是 Fe(Ⅲ)和 Mn(Ⅴ)氧化物还原必要的蛋白[55]。免疫定位研究表明,在 Fe(Ⅲ)氧化物作电子受体时,细胞中 OmcE 的含量要明显低于 OmcS,而且 OmcE 与 OmcS 不同,OmcS 位于沿着电子传递方向的菌毛附近,可将电子直接传递到胞外,这也进一步说明了在金属氧化物的还原中,OmcE 并不起主要作用[56]。

3.4 OmcF

OmcF(GSU2432)位于外膜蛋白,只含 1 种血红素,分子量大小为 10kDa,其结构与光合藻类 Monoraphidium 中细胞色素 c6 高度类似,是一种参与在光合作用中电子传递的细胞色素 c[57]。研究表明,*omcF* 参与了 *omcB* 的表达,缺失 *omcF* 使 *omcB* 转录水平大大降低,Fe(Ⅲ)的还原能力也有所下降[58]。缺失 *omcF* 的突变株在以 Fe(Ⅲ)氧化物作为电子受体时的生长状态明显降低,而以 Mn(Ⅴ)作电子受体时并没有影响[52]。产生这一结果的原因是由于 *omcF* 的缺失直接或间接影响 *omcB* 的表达能力,导致 Fe(Ⅲ)的还原能力降低,由于 *omcB* 并不是 Mn(Ⅴ)还原的主要途径,因此缺失 *omcF* 对 Mn(Ⅴ)的还原并无影响。

3.5 OmcZ

OmcZ(GSU2076)是一种与细胞外基质相联的细胞色素 c,并不存在于所有 *Geobacter* 中,OmcZ 有两种存在形式:$OmcZ_L$(50kDa)和 OmcZs(30kDz),而对其亚细胞定位研究表明,OmcZs 是 OmcZ 胞外存在的主要形式,包含 8 个血红素,其氧化还原电势从-420 到-60mV[59-60]。$OmcZ_L$ 在周质和外膜内完成转移后的修饰加工,而大多数的 OmcZs 存在于细胞外基质[59]。在以石墨电极为唯一的电子受体时,OmcZ 是产电过程中最重要的细胞色素,缺少 *omcZ* 的突变体使电流减少 90%以上,但它并不参与延胡索酸盐、柠檬酸铁或 Fe(Ⅲ)氧化物的还原[61]。近年来研究发现,OmcZ 在 Mn(Ⅴ)氧化物作为电子受体时的生长数量明显增多[52],也就说明 OmcZ 可还原 Mn(Ⅴ),但不能还原 Fe(Ⅲ),这与 Kengo 等[59]的研究结果一致,由于 Mn(Ⅴ)氧化物的中点电位在 25℃,pH 值为 7 时可达到 500—600mV,远高于 OmcZ(-220mV),而 OmcZ 与 Fe(Ⅲ)氧化物中间电位(-300mV)相差不大,因此 OmcZ 可快速将电子传递到 Mn(Ⅴ)。但缺失 OmcZ 的突变株对 Fe(Ⅲ)及 Mn(Ⅴ)的还原并没有影响[52],说明 OmcZ 也不是参与 Mn(Ⅴ)还原的主要细胞色素 c。

3.6 OmpB 和 OmpC

OmpB 和 OmpC 不属于细胞色素 c,它们是由硫还原单胞菌中的 4 个基因编码的多铜氧化酶蛋白,OmpC 与生盘纤发菌中的 MofA 较为接近,它是参与 Mn(IV)氧化的功能蛋白[62-63]。而 OmpB 与枯草杆菌中的漆酶较为类似[64-65],位于细胞外基质,OmpC 与它相邻[66]。因此这两种蛋白具有将电子传递到胞外不溶性电子受体的潜力。在 *G. sulfurreducens* 中,这两种基因对 Fe(Ⅲ)或 Mn(Ⅴ)的还原起重要作用[66-67]。基因芯片分析表明,*ompB* 对 Fe(Ⅲ)及 Mn(Ⅴ)的还原起主要作用,而 *ompC* 仅参与 Fe(Ⅲ)的还原,其还原能力相对 *ompB* 较弱[52]。

3.7 T4P

相比 *Shewanella* 需要利用 OmcA 与 MtrC 来进行胞外的电子传递, *Geobacter* 则利用菌毛将电子从外膜蛋白传递到胞外电子受体[68]。研究表明,*G. sulfurreducens* 上的菌毛具有强导电性,并不需要与胞外不溶性电子受体直接接触,它具有作为纳米导线的潜在作用,可利用纳米导线将电子从胞内传递到胞外受体[69]。硫还原

单胞菌中 T4P(Type Ⅳ pili)是电子到达胞外受体有效的传递方式[69]。T4P 直径为 60—90Å,长度 1μm,由上千种菌毛蛋白构成[70]。T4P 高度保守的 N 末端 α-螺旋作为高度聚合域,菌毛的表面结构由 C 末端可变的球状域形成,并决定了菌毛的多种功能[70]。将丧失形成菌毛的突变体培养在以不可溶的 Fe(Ⅲ)作电子接受体的培养基中,发现其不能还原 Fe(Ⅲ)。还有研究表明,野生菌株对 U(Ⅵ)的还原能力也明显强于丧失产生菌毛的突变体。PliA 还促进蛋白的转移,因此缺失 *pilA*,其突变体中外膜上相关的细胞色素 c 不能够准确定位。

4　存在的问题与研究展望

尽管目前已经清楚了 *S. oneidensis* MR-1 与 *G. sulfurreducens* 胞内电子传递过程及其位于内膜、周质和外膜上的部分细胞色素 c 在胞内电子转移中的功能与相互关系,但对胞外呼吸菌胞内电子转移过程的研究还有许多问题尚未解决。首先,MtrB 是否促进了电子从外膜传递到细胞表面这一点仍然是不确定的,MtrB 结构及功能的研究是必要的,以揭示其是否直接参与了电子传递过程;其次,电子从外膜蛋白 CymA 到 MtrA 是如何传递的,在周质参与其转移的蛋白有哪些尚未完全确定。细胞色素 c 具有专一性,参与电子传递的细胞色素 c可识别位于胞外不同的电子受体,但胞外呼吸菌是如何通过调节自身的分子结构来改变其参与电子传递的蛋白组分或采用不同的电子转移途径来进行识别的,这一问题也仍是未知。*G. sulfurreducens* 的外膜蛋白及纳米导线是电子传递过程中重要的组成部分,可介导不同菌群间直接或间接的电子传递,研究表明 *Geobacter* 与产甲烷菌为共生关系并且两种菌群之间可进行电子传递,但大多数的产甲烷菌并不含有细胞色素 c[71],因此,对于不含细胞色素的菌群,*Geobacter* 与 *Shewanella* 是利用何种机制相互识别并进行传递电子的,这一过程也需要进一步研究。在复杂条件下进行胞外电子传递时,同一种微生物胞内电子传递过程中参与的蛋白及传递机制是否相同,哪些蛋白参与其主要作用以及由哪些菌群协同完成还有待于进一步研究。现阶段研究的胞外呼吸菌仅占自然界极小部分,胞内电子传递机制的研究也仅限于 *Geobacter* 与 *Shewanella*。因此,要分离出更多的胞外呼吸菌,完善其参与电子传递链重要组分及细胞色素 c 的分子学机制,并研究其在多种复杂条件的胞外电子传递过程,才可有效解决污染物的难降解和微生物产电效率低等实际问题。

参考文献(References):

[1] Jeffrey A Gralnick, Dianne K Newman. Extracellular respiration. Molecular Microbiology, 2007, 65(1): 1-11.

[2] Derek R Lovley. Extracellular electron transfer: wires, capacitors, iron lungs, and more. Geobiology, 2008, 6(3): 225-231.

[3] 马晨, 周顺桂, 庄莉, 武春媛. 微生物胞外呼吸电子传递机制研究进展. 生态学报, 2011, 31(7): 2008-2018.

[4] Claudia M Martinez, Luis H Alvarez, Lourdes B Celis, Francisco J Cervantes. Humus-reducing microorganisms and their valuable contribution in environmental processes. Applide Microbiology Biotechnology, 2013, 97(24): 10293-10308.

[5] Xu W, Hu P, Li Y H, Li X M, Zhou S G. Mechanisms of microbial Fe (Ⅲ) respiration: A review. Chinese Journal of Ecology, 2008, 27(6): 1037-1042.

[6] 武春援, 李芳柏, 周顺桂. 腐殖质呼吸作用及其生态学意义. 生态学报, 2009, 29(3): 1535-1542.

[7] Derek R Lovley. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. Nature Reviews Microbiology, 2006, 4(7): 497-508.

[8] Derek R Lovley, Kazem Kashefi, Madelline Vargas, Jason M Tor, Elizabeth L Blunt-Harris. Reduction of humic substances and Fe (III) by hyperthermophilic microorganisms. Chemical Geology, 2000, 169(3/4): 289-298.

[9] John F Heidelberg, Ian T Paulsen, Karen E Nelson, Eric J Gaidos, William C Nelson, Timothy D Read, Jonathan A Eisen, Rekha Seshadri, Naomi Ward, Barbara Methe, Rebecca A Clayton, Terry Meyer, Alexandre Tsapin, James Scott, Maureen Beanan, Lauren Brinkac, Sean Daugherty, Robert T DeBoy, Robert J Dodson, A Scott Durkin, Daniel H Haft, James F Kolonay, Ramana Madupu, Jeremy D Peterson, Lowell A Umayam, Owen White, Alex M Wolf, Jessica Vamathevan, Janice Weidman, Marjorie Impraim, Kathy Lee, Kristy Berry, Chris Lee, Jacob Mueller, Hoda Khouri, John Gill, Terry R Utterback, Lisa A McDonald, Tamara V Feldblyum, Hamilton O Smith, J Craig Venter, Kenneth H Nealson, Claire M Fraser. Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. Nature Biotechnology, 2002, 20(11): 1118-1123.

[10] B A Methé, K E Nelson, J A Eisen, I T Paulsen, W Nelson, J F Heidelberg, D Wu, M Wu, N Ward, M J Beanan, R J Dodson, R Madupu, L M Brinkac, S C Daugherty, R T DeBoy, A S Durkin, M Gwinn, J F Kolonay, S A Sullivan, D H Haft, J Selengut, T M Davidsen, N Zafar, O White, B Tran, C Romero, H A Forberger, J Weidman, H Khouri, T V Feldblyum, T R Utterback, S E Van Aken, D R Lovley, C M Fraser. Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments. Science, 2003, 302(5652): 1967-1969.

[11] Shi L, Thomas C Squier, John M Zachara, James K Fredrickson. Respiration of metal (hydr) oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multihaem *c*-type cytochromes. Molecular Microbiology, 2007, 65(1): 12-20.

[12] Julie M Stevens, Oliver Daltrop, James W A Allen, Stuart J Ferguson. *C*-type cytochrome formation: chemical and biological enigmas. Accounts of Chemical Research, 2004, 37(12): 999-1007.

[13] Maria Luisa Rodrigues, Tânia F Oliveira, Inês A C Pereira, Margarida Archer. X-ray structure of the membrane-bound cytochrome *c* quinol dehydrogenase NrfH reveals novel haem coordination. The EMBO Journal, 2006, 25(24): 5951-5960.

[14] Orianna Bretschger, Anna Obraztsova, Carter A Sturm, In Seop Chang, Yuri A Gorby, Samantha B Reed, David E Culley, Catherine L Reardon, Soumitra Barua, Margaret F Romine, Jizhong Zhou, Alexander S Beliaev, Rachida Bouhenni, Daad Saffarini, Florian Mansfeld, Byung-Hong Kim, James K Fredrickson, Kenneth H Nealson. Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(21): 7003-7012.

[15] Daad A Saffarini, Seth L Blumerman, Karen J Mansoorabadi. Role of menaquinones in Fe (Ⅲ) reduction by membrane fractions of *Shewanella putrefaciens*. Journal of Bacteriology, 2002, 184(3): 846-848.

[16] Alex S Beliaev, Daad A Saffarini, Jennifer L McLaughlin, David Hunnicutt. MtrC, an outer membrane decahaem *c* cytochrome required for metal reduction in *Shewanella putrefaciens* MR-1. Molecular Microbiology, 2001, 39(3): 722-730.

[17] Charles R Myers, Judith M Myers. MtrB is required for proper incorporation of the cytochromes OmcA and OmcB into the outer membrane of *Shewanella putrefaciens* MR-1. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(11): 5585-5594.

[18] Katy E Pitts, Paul S Dobbin, Francisca Reyes-Ramirez, Andrew J Thomson, David J Richardson, Harriet E Seward. Characterization of the *Shewanella oneidensis* MR-1 Decaheme Cytochrome MtrA expression in *Escherichia coli* confers the ability to reduce soluble Fe(Ⅲ) chelates. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(30): 27758-27765.

[19] Kelly P Nevin, Sarah A Hensley, Ashley E Franks, Zarath M Summers, Jianhong Ou, Trevor L Woodard, Oona L Snoeyenbos-West, Derek R Lovley. Electrosynthesis of organic compounds from carbon dioxide is catalyzed by a diversity of acetogenic microorganisms. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(9): 2882-2886.

[20] Myers C R, Myers J M. Cloning and sequence of cymA, a gene encoding a tetraheme cytochrome c required for reduction of iron (Ⅲ), fumarate, and nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-1. Journal of Bacteriology, 1997, 179(4): 1143-1152.

[21] Carsten Schwalb, Stephen K Chapman, Graeme A Reid. The tetraheme cytochrome CymA is required for anaerobic respiration with dimethyl sulfoxide and nitrite in *Shewanella oneidensis*. Biochemistry, 2003, 42(31): 9491-9497.

[22] Douglas P Lies, Maria E Hernandez, Andreas Kappler, Randall E Mielke, Jeffrey A Gralnick, Dianne K Newman. *Shewanella oneidensis* MR-1 uses overlapping pathways for iron reduction at a distance and by direct contact under conditions relevant for biofilms. Applied Environmental Microbiology, 2005, 71(8): 4414-4426.

[23] Mackenzie A Firer-Sherwood, Kathryn D Bewley, Jee-Young Mock, Sean J Elliott. Tools for resolving complexity in the electron transfer networks of multiheme cytochromes *c*. Metallomics, 2011, 3(4): 344-348.

[24] Jimmy Borloo, Lina Desmet, Jozef Van Beeumen, Bart Devreese. Bacterial two-hybrid analysis of the Shewanella oneidensis MR-1 multi-component electron transfer pathway. Journal of Integrated OMICS, 2011, 1(2): 260-267.

[25] Myers C R, Myers J M. Cell surface exposure of the outer membrane cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1. Letters in Applied Microbiology, 2003, 37(3): 254-258.

[26] Myers C R, Myers J M. The outer membrane cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1 are lipoproteins. Letters in Applied Microbiology, 2004, 39(5): 466-470.

[27] Judith M Myers, Charles R Myers. Role for outer membrane cytochromes OmcA and OmcB of *Shewanella putrefaciens* MR-1 in reduction of manganese dioxide. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(1): 260-269.

[28] Katrin Richter, Marcus Schicklberger, Johannes Gescher. Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(4): 913-921.

[29] Daniel Baron, Edward LaBelle, Dan Coursolle, Jeffrey A Gralnick, Daniel R Bond. Electrochemical measurement of electron transfer kinetics by *Shewanella oneidensis* MR-1. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(42): 28865-28873.

[30] Jimmy Borloo, Bjorn Vergauwen, Lina De Smet, Ann Brigé, Bart Motte, Bart Devreese, Jozef Van Beeumen. A kinetic approach to the dependence of dissimilatory metal reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 on the outer membrane cytochromes *c* OmcA and OmcB. FEBS Journal, 2007, 274(14): 3728-3738.

[31] Myers J M, Myers C R. Overlapping role of the outer membrane cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1 in the reduction of manganese (Ⅳ) oxide. Letters in Applied Microbiology, 2003, 37(1): 21-25.

[32] Yuri A Gorby, Svetlana Yanina, Jeffrey S McLean, Kevin M Rosso, Dianne Moyles, Alice Dohnalkova, Terry J Beveridge, In Seop Chang, Byung Hong Kim, Kyung Shik Kim, David E Culley, Samantha B Reed, Margaret F Romine, Daad A Saffarini, Eric A Hill, Liang Shi, Dwayne A Elias, David W Kennedy, Grigoriy Pinchuk, Kazuya Watanabe, Shun′ichi Ishii, Bruce Logan, Kenneth H Nealson, Jim K Fredrickson. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. Proceedings of the National Academy of

Sciences of the United States of America, 2006, 103(30): 11358-11363.

[33] Thomas J DiChristina, Charles M Moore, Carolyn A Haller. Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction by *Shewanella putrefaciens* requires *ferE*, a homolog of the *pulE* (*gspE*) type II protein secretion gene. Journal of Bacteriology, 2002, 184(1): 142-151.

[34] Shi L, Deng S, Matthew J Marshall, Wang Z M, David W Kennedy, Alice C Dohnalkova, Heather M Mottaz, Eric A Hill, Yuri A Gorby, Alexander S Beliaev, David J Richardson, John M Zachara, James K Fredrickson. Direct involvement of type II secretion system in extracellular translocation of *Shewanella oneidensis* outer membrane cytochromes MtrC and OmcA. Journal of Bacteriology, 2008, 190(15): 5512-5516.

[35] Jeffrey A Gralnick, Hojatollah Vali, Douglas P Lies, Dianne K Newman. Extracellular respiration of dimethyl sulfoxide by *Shewanella oneidensis* strain MR-1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(12): 4669-4674.

[36] Dan Coursolle, Jeffrey A Gralnick. Modularity of the Mtr respiratory pathway of *Shewanella oneidensis* strain MR-1. Molecula Microbiology, 2010, 77(4): 995-1008.

[37] Thomas A Clarke, Marcus J Edwards, Andrew J Gates, Andrea Hall, Gaye F White, Justin Bradley, Catherine L Reardon, Liang Shi, Alexander S Beliaev, Matthew J Marshall, Zheming Wang, Nicholas J Watmough, James K Fredrickson, John M Zachara, Julea N Butt, David J Richardson. Structure of a bacterial cell surface decaheme electron conduit. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(23): 9384-9389.

[38] Robert S Hartshorne, Catherine L Reardon, Daniel Ross, Jochen Nuester, Thomas A Clarke, Andrew J Gates, Paul C Mills, Jim K Fredrickson, John M Zachara, Shi L, Alex S Beliaev, Matthew J Marshall, Ming Tien, Susan Brantley, Julea N Butt, David J Richardson. Characterization of an electron conduit between bacteria and the extracellular environment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(52): 22169-22174.

[39] David J Richardson, Marcus J Edwards, Gaye F White, Nanakow Baiden, Robert S Hartshorne, Jim Fredrickson, Shi L, John Zachara, Andrew J Gates, Julea N Butt, Thomas Clarke. Exploring the biochemistry at the extracellular redox frontier of bacterial mineral Fe (III) respiration. Biochemical Society Transactions, 2012, 40(3): 493-500.

[40] Thomas Clarke, Jeffrey A Cole, David Richardson, Andrew M Hemmings. The crystal structure of the pentahaem c-type cytochrome NrfB and characterization of its solution-state interaction with the pentahaem nitrite reductase NrfA. Biochemical Journal, 2007, 406(1): 19-30.

[41] Marian Breuer, Kevin M Rosso, Jochen Blumberger. Electron flow in multiheme bacterial cytochromes is a balancing act between heme electronic interaction and redox potentials. Proceedings of the National Academy of Sciences of the Unite States of America, 2014, 111(2): 611-616.

[42] Kelly P Nevin, Derek R Lovley. Mechanisms for Fe (III) oxide reduction in sedimentary environments. Geomicrobiology Journal, 2002, 19(2): 141-159.

[43] Kelly P Nevin, Derek R Lovley. Mechanisms for accessing insoluble Fe (III) oxide during dissimilatory Fe (III) reduction by *Geothrix fermentans*. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(5): 2294-2299.

[44] Kelly P Nevin, Derek R Lovley. Lack of production of electron-shuttling compounds or solubilization of Fe (III) during reduction of insoluble Fe (III) oxide by *Geobacter metallireducens*. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(5): 2248-2251.

[45] Jessica E Butler, Franz Kaufmann, Maddalena V Coppi, Cinthia Núñez, Derek R Lovley. MacA, a diheme *c*-type cytochrome involved in Fe (III) reduction by *Geobacter sulfurreducens*. Journal of Bacteriology, 2004, 186(12): 4042-4045.

[46] Jon R Lloyd, Ching Leang, Allison L Hodges Myerson, Maddalena V Coppi, Stacey Cuifo, Barb Methe, Steven J Sandler, Derek R Lovley. Biochemical and genetic characterization of PpcA, a periplasmic c-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. Biochemical Journal, 2003, 369: 153-161.

[47] Ching Leang, M V Coppi, D R Lovley. OmcB, a c-type polyheme cytochrome, involved in Fe (III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. Journal of Bacteriology, 2003, 185(7): 2096-2103.

[48] Byoung-Chan Kim, Derek R Lovley. Investigation of direct vs. indirect involvement of the *c*-type cytochrome MacA in Fe (III) reduction by *Geobacter sulfurreducens*. FEMS Microbiology Letters, 2008, 286(1): 39-44.

[49] Julian Seidel, Maren Hoffmann, Katie E Ellis, Antonia Seidel, Thomas Spatzal, Stefan Gerhardt, Sean J Elliott, and Oliver Einsle. MacA is a second cytochrome *c* peroxidase of *Geobacter sulfurreducens*. Biochemistry, 2012, 51(13): 2747-2756.

[50] Ching Leang, L A Adams, K J Chin, K P Nevin, B A Methé, J Webster, M L Sharma, D R Lovley. Adaptation to disruption of the electron transfer pathway for Fe (III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. Journal of Bacteriology, 2005, 187(17): 5918-5926.

[51] Yan-Huai R Ding, Kim K Hixson, Muktak A Aklujkar, Mary S Lipton, Richard D Smith, Derek R Lovley, Tünde Mester. Proteome of *Geobacter sulfurreducens* grown with Fe (III) oxide or Fe (III) citrate as the electron acceptor. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2008, 1784(12): 1935-1941.

[52] M Aklujkar, M V Coppi, C Leang, B C Kim, M A Chavan, L A Perpetua, L Giloteaux, A Liu, D E Holmes. Proteins involved in electron transfer to Fe (III) and Mn (IV) oxides by *Geobacter sulfurreducens* and *Geobacter uraniireducens*. Microbiology, 2013, 159(Pt 3): 515-535.

[53] Qian X L, Tünde Mester, Leonor Morgado, Tsutomu Arakawa, Manju L Sharma, Kengo Inoue, Crisjoe Joseph, Carlos A Salgueiro, Michael J Maroney, Derek R Lovley. Biochemical characterization of purified OmcS, a *c*-type cytochrome required for insoluble Fe (III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2011, 1807(4): 404-412.

[54] Ching Leang, Qian X L, Tünde Mester, Derek R Lovley. Alignment of the *c*-type cytochrome OmcS along pili of *Geobacter sulfurreducens*. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(12): 4080-4084.

[55] T Mehta, M V Coppi, S E Childers, D R Lovley. Outer membrane *c*-type cytochromes required for Fe (Ⅲ) and Mn (Ⅳ) oxide reduction in *Geobacter sulfurreducens*. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8634-8641.

[56] Derek R Lovley, Toshiyuki Ueki, Zhang T, Nikhil S Malvankar, Pravin M Shrestha, Kelly A Flanagan, Muktak Aklujkar, Jessica E Butler, Ludovic Giloteaux, Amelia-Elena Rotaru, Dawn E Holmes, Ashley E Franks, Roberto Orellana, Carla Risso, Kelly P Nevin. Geobacter: the microbe electric's physiology, ecology, and practical applications. Advances in Microbial Physiology, 2011, 59: 1-100.

[57] P R Pokkuluri, Y Y Londer, N E C Duke, M Pessanha, X Yang, V Orshonsky, L Orshonsky, J Erickson, Y Zagyanskiy, C A Salgueiro, M Schiffer. Structure of a novel dodecaheme cytochrome *c* from *Geobacter sulfurreducens* reveals an extended 12 nm protein with interacting hemes. Journal of Structural Biology, 2011, 174(1): 223-233.

[58] Byoung-Chan Kim, Ching Leang, Yan-Huai R Ding, Richard H Glaven, Maddalena V Coppi, and Derek R Lovley. OmcF, a putative *c*-type monoheme outer membrane cytochrome required for the expression of other outer membrane cytochromes in *Geobacter sulfurreducens*. Journal of Bacteriology, 2005, 187(13): 4505-4513.

[59] Kengo Inoue, Qian X L, Leonor Morgado, Byoung-Chan Kim, Tünde Mester, Mounir Izallalen, Carlos A. Salgueiro, Derek R Lovley. Purification and characterization of OmcZ, an outer-surface, octaheme *c*-type cytochrome essential for optimal current production by *Geobacter sulfurreducens*. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(12): 3999-4007.

[60] Kengo Inoue, Ching Leang, Ashley E Franks, Trevor L Woodard, Kelly P Nevin, Derek R Lovley. Specific localization of the *c*-type cytochrome OmcZ at the anode surface in current-producing biofilms of *Geobacter sulfurreducens*. Environmental Microbiology Reports, 2011, 3(2): 211-217.

[61] Kelly P Nevin, Byoung-Chan Kim, Richard H Glaven, Jessica P Johnson, Trevor L Woodard, Barbara A Methé, Raymond J DiDonato Jr, Sean F Covalla, Ashley E Franks, Liu A N, Derek R Lovley. Anode biofilm transcriptomics reveals outer surface components essential for high density current production in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. PLoS One, 2009, 4(5): e5628.

[62] P L Corstjens, J P De Vrind, P Westbroek, E W De Vrind-De Jong. Enzymatic iron oxidation by *Leptothrix discophora*: identification of an iron-oxidizing protein. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(2): 450-454.

[63] Iman A El Gheriany, Daniela Bocioaga, Anthony G Hay, William C Ghiorse, Michael L Shuler, Leonard W Lion. Iron requirement for Mn (Ⅱ) oxidation by *Leptothrix discophora* SS-1. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(5): 1229-1235.

[64] Francisco J Enguita, Lígia O Martins, Adriano O Henriques, Maria Arménia Carrondo. Crystal structure of a bacterial endospore coat component: a laccase with enhanced thermostability properties. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(21): 19416-19425.

[65] Marie-Françoise Hullo, Ivan Moszer, Antoine Danchin, Isabelle Martin-Verstraete. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. Journal of Bacteriology, 2001, 183(18): 5426-5430.

[66] Dawn E Holmes, Tünde Mester, Regina A O'Neil, Lorrie A Perpetua, M Juliana Larrahondo, Richard Glaven, Manju L Sharma, Joy E Ward, Kelly P Nevin, Derek R Lovley. Genes for two multicopper proteins required for Fe (Ⅲ) oxide reduction in *Geobacter sulfurreducens* have different expression patterns both in the subsurface and on energy-harvesting electrodes. Microbiology, 2008, 154(5): 1422-1435.

[67] Teena Mehta, Susan E Childers, Richard Glaven, Derek R Lovley, Tünde Mester. A putative multicopper protein secreted by an atypical type II secretion system involved in the reduction of insoluble electron acceptors in *Geobacter sulfurreducens*. Microbiology, 2006, 152(8): 2257-2264.

[68] Susan E Childers, Stacy Ciufo, Derek R Lovley. *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe (Ⅲ) oxide by chemotaxis. Nature, 2002, 416(6882): 767-769.

[69] Gemma Reguera, Kevin D McCarthy, Teena Mehta, Julie S Nicoll, Mark T Tuominen, Derek R Lovley. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. Nature, 2005, 435(7045): 1098-1101.

[70] S Kolappan, E N Tracy, L O Bakaletz, R S Munson, L Craig. Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of PilA from the nontypeable *Haemophilus influenzae* type IV pilus. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 2012, 68(3): 284-287.

[71] Masahiko Morita, Nikhil S Malvankar, Ashley E Franks, Zarath M Summers, Ludovic Giloteaux, Amelia E Rotaru, Camelia Rotaru, Derek R Lovley. Potential for direct interspecies electron transfer in methanogenic wastewater digester aggregates. MBio, 2011, 2(4): e00159-11.